(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2004-337101
(P2004-337101A)
(43)公開日　平成16年12月2日(2004.12.2)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N 15/00	ZNAA	4B024
C12Q 1/68	C12Q 1/68		4B063

審査請求 未請求　請求項の数 12　OL　（全 27 頁）

(21)出願番号　特願2003-139080(P2003-139080)
(22)出願日　平成15年5月16日(2003.5.16)

（出願人による申告）国等の委託研究の成果に係る特許出願（平成１４年度新エネルギー・産業技術総合開発機構、生分解・処理メカニズムの解析と制御技術の開発、産業活力再生特別措置法第３０条の適用を受けるもの）

(71)出願人　591001949
株式会社海洋バイオテクノロジー研究所
岩手県釜石市平田第３地割７５番１号
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節
(74)代理人　100120905
弁理士　深見　伸子
(72)発明者　内山　拓
岩手県釜石市平田第３地割７５番１　株式会社海洋バイオテクノロジー研究所内
(72)発明者　渡辺　一哉
岩手県釜石市平田第３地割７５番１　株式会社海洋バイオテクノロジー研究所内
最終頁に続く

(54)【発明の名称】代謝系遺伝子のクローニング法

(57)【要約】
【課題】迅速かつ高効率に代謝系遺伝子及びその発現制御因子を単離する方法の提供。
【解決手段】以下のステップを含む、特定の基質の存在下にて誘導される代謝系遺伝子及びその発現制御因子を単離する方法。
（ａ）サンプルＤＮＡを、該サンプルＤＮＡがプロモーターとレポーター遺伝子との間に挿入されるように発現ベクターに導入するステップ
（ｂ）上記発現ベクターを宿主細胞に導入するステップ
（ｃ）上記宿主細胞を上記プロモーターが誘導される条件で培養した後、上記レポーター遺伝子を発現する細胞を除去するステップ
（ｄ）上記宿主細胞を上記特定の基質の存在下で培養した後、上記レポーター遺伝子を発現する細胞を採取するステップ
（ｅ）採取した細胞からサンプルＤＮＡを単離するステップ
【選択図】　なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
特定の基質の存在下にて誘導される代謝系遺伝子及びその発現制御因子を単離する方法であって、以下のステップ：
（ａ）サンプルＤＮＡを、該サンプルＤＮＡがプロモーターとレポーター遺伝子との間に挿入されるように発現ベクターに導入するステップ；
（ｂ）上記発現ベクターを宿主細胞に導入するステップ；
（ｃ）上記宿主細胞を上記プロモーターが誘導される条件で培養した後、上記レポーター遺伝子を発現する細胞を除去するステップ；
（ｄ）上記宿主細胞を上記特定の基質の存在下で培養した後、上記レポーター遺伝子を発現する細胞を採取するステップ；
（ｅ）採取した細胞からサンプルＤＮＡを単離するステップ；
を含む、上記方法。
【請求項２】
サンプルＤＮＡが、複数の生物のゲノムを含むサンプルからから調製される、請求項１記載の方法。
【請求項３】
サンプルＤＮＡが、環境サンプル、発酵槽サンプル、又はこれらのサンプルの集積培養サンプルから調製される、請求項２記載の方法。
【請求項４】
ステップ（ａ）において、複数のサンプルＤＮＡの各々を発現ベクターに導入し、サンプルＤＮＡライブラリーを作製するものである、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５】
レポーター遺伝子が、蛍光タンパク質をコードする遺伝子、酵素をコードする遺伝子、又は宿主細胞が天然には有しない細胞表面抗原をコードする遺伝子である、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６】
蛍光タンパク質が緑色蛍光タンパク質である、請求項５記載の方法。
【請求項７】
レポーター遺伝子の発現を上記細胞表面抗原に対する抗体を用いて検出する、請求項５記載の方法。
【請求項８】
レポーター遺伝子の発現をフローサイトメトリーにより検出する、請求項５～７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９】
ステップ（ｃ）及び（ｄ）における宿主細胞の培養を、通常用いられる培地濃度の１／１００～１／５の濃度の培地を用いて行う、請求項１～８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０】
ステップ（ｅ）で単離したサンプルＤＮＡをプローブとして用いることにより、又は単離したサンプルＤＮＡの塩基配列に基づいてプライマー若しくはプローブを設計することにより、該プライマー又はプローブを用いてサンプルＤＮＡの周辺に存在する遺伝子又は遺伝子断片を単離するステップをさらに含む、請求項１～９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１】
プロモーター、レポーター遺伝子、及び該プロモーターと該レポーター遺伝子との間にサンプルＤＮＡを挿入するためのクローニング部位を有する、請求項１～１０のいずれか１項に記載の方法に使用するための発現ベクター。
【請求項１２】
配列番号１に示す配列を有するものである、請求項１１記載の発現ベクター。
【発明の詳細な説明】

【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は、代謝系遺伝子及びその発現制御因子の単離方法に関する。また本発明は、該単離方法に使用するための発現ベクターに関する。
【０００２】
【従来の技術】
近年、微生物等のもつ代謝系酵素を利用したバイオプロセスが特定の化学物質の生産に利用されるようになってきている。これに伴い、微生物等から新規代謝系酵素の遺伝子を獲得する試みが盛んに行われるようになった。特定の代謝系酵素の遺伝子を獲得する際には、通常、まず目的の活性を有する生物を環境サンプルから単離し、次にその単離された生物から代謝系遺伝子のクローニングを試みる。しかし近年、分子生態解析の手法が確立された結果、環境中の大多数の微生物は未だに培養・単離されておらず、またそれらの多くが難培養であると考えられるようになっている（Ａｍｍａｎ，ＲＩ ｅｔ ａｌ．，Ｐｈｙｌｏｇｅｎｅｔｉｃ ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ａｎｄ ｉｎ ｓｉｔｕ ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｏｆ ｉｎｄｉｖｉｄｕａｌ ｍｉｃｒｏｂｉａｌ ｃｅｌｌｓ ｗｉｔｈｏｕｔ ｃｕｌｔｉｖａｔｉｏｎ．，Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｒｅｖ．１９９５，５９：１４３－６９）。このことは、微生物等の培養・単離を介したのでは、環境中の多様な遺伝子の大多数を獲得できないことを意味している。
【０００３】
そこで最近、微生物等を単離培養することなく直接メタゲノムを抽出し、これから作製したメタゲノムライブラリーを利用して特定機能を有する遺伝子をスクリーニングする試みがなされるようになってきている（非特許文献１）。このような単離された生物のゲノムや環境メタゲノムからの代謝系遺伝子のスクリーニングには、現在２つの方法が用いられている。すなわち、遺伝子配列に依存したスクリーニングと酵素活性に依存したスクリーニングである。第一の方法（遺伝子配列に依存したスクリーニング）は、既知の遺伝子配列から設計されたプローブやプライマーを用いて類似遺伝子を獲得しようとするものである（非特許文献２）。しかし、この方法において用いられるプローブやプライマーは、過去に単離された培養しやすい微生物等からクローニングされた少数の遺伝子の相同領域を基に設計されている。このため、配列の相同性が低い遺伝子はクローニングし難く、また環境中の多様な遺伝子プールからほんの一握りの類似遺伝子しか回収できないと考えられる。一方、第二の方法（酵素活性に依存したスクリーニング）においては、大腸菌などの宿主細胞を用いたショットガンライブラリーがまず構築され、コロニーとして単離された各々のクローンの活性を１つずつ検出していく（非特許文献３）。しかし、多くの酵素については、元来の宿主でない細胞内で活性を有する形で発現させるのは難しいと考えられる。またこの方法では、巨大な環境メタゲノムライブラリーのスクリーニングに多大な労力と時間を要する（時には数百万クローンから数個のポジティブクローンを選択しなければならない）。
【０００４】
上述したように、従来から用いられているスクリーニング法では、既知の代謝系遺伝子と類似性が低い代謝系遺伝子をクローニングすることは難しい。また、環境メタゲノムからのスクリーニングにおいては、ライブラリー内の多様な代謝系遺伝子の一部しか獲得できない。さらに上記の従来型スクリーニング法では、多大な労力と時間を要する。
【０００５】
上記の問題を解消するため、最近、特定の刺激の存在下にて活性化される調節因子の単離方法が報告された（特許文献１参照）。この方法は、ゲノムを断片化したＤＮＡサンプルを緑色蛍光タンパク質遺伝子の上流に挿入して複数の調節因子を含む発現ベクターライブラリーを構築し、これを細胞に導入した後、この細胞を特定の刺激の存在下又は非存在下にて培養し、調節因子によって誘導される緑色蛍光タンパク質の発現レベルに応じて該細胞を蛍光活性化セルソーティング（ＦＡＣＳ）により選別することにより、目的とする調節因子を単離するものである。しかし、この方法の選別手法では、ＤＮＡサンプルの挿入

されていないセルフライゲーションベクターを含む細胞など、目的とする調節因子を含まない細胞であっても調節因子が含まれるものとしてその細胞が選別される（偽陽性）ことがあり、また強力に発現されない遺伝子を単離しようとする場合には良好に単離することができなかった。

【０００６】

よって、新規な代謝系遺伝子を確実、迅速かつ効率的に単離するために、新しいスクリーニング法の開発が求められている。

【０００７】

【特許文献１】

米国特許第５，９９４，０７７号

【非特許文献１】

Ｌｏｒｅｎｚ，Ｐ．ｅｔａｌ．，Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．（英国）２００２年，第１３巻第５７２－７頁

【非特許文献２】

Ｓｔｏｋｅｓ，ＨＷ ｅｔ ａｌ．，Ａｐｐｌ Ｅｎｖｉｒｏｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．（米国）２００１年，第６７巻第５２４０－６頁

【非特許文献３】

Ｈｅｎｎｅ，Ａ．ｅｔ ａｌ．，Ａｐｐｌ Ｅｎｖｉｒｏｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．（米国）１９９９年，第６５巻第３９０１－７頁

【０００８】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、迅速かつ高効率に代謝系遺伝子及びその発現制御因子を単離する方法を提供することを目的とする。

【０００９】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、代謝系遺伝子及びその発現制御因子を単離する方法において、サンプルＤＮＡをレポーター遺伝子の上流に挿入した発現ベクターを細胞に導入した後、上記サンプルＤＮＡによって発現制御される上記レポーター遺伝子の発現を検出することによって、発現制御因子を含む細胞を選別できることを確認した。さらに、セルフライゲーションした発現ベクターを含む細胞を除去するスクリーニング工程を加えることにより、迅速、効率的かつ確実に目的とする代謝系遺伝子及びその発現制御因子を単離することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

【００１０】

すなわち、本発明は、以下のステップを含む、特定の基質の存在下にて誘導される代謝系遺伝子及びその発現制御因子を単離する方法である。

（ａ）サンプルＤＮＡを、該サンプルＤＮＡがプロモーターとレポーター遺伝子との間に挿入されるように発現ベクターに導入するステップ

（ｂ）上記発現ベクターを宿主細胞に導入するステップ

（ｃ）上記宿主細胞を上記プロモーターが誘導される条件で培養した後、上記レポーター遺伝子を発現する細胞を除去するステップ

（ｄ）上記宿主細胞を上記特定の基質の存在下で培養した後、上記レポーター遺伝子を発現する細胞を採取するステップ

（ｅ）採取した細胞からサンプルＤＮＡを単離するステップ

【００１１】

上記単離方法において、サンプルＤＮＡは、例えば環境サンプル、単一生物サンプル、混合生物サンプル、発酵槽サンプル、集積培養サンプル又は培養細胞サンプルから調製されるものとすることができる。上記単離方法は、特に、複数の生物のゲノムを含むサンプルから調製されたサンプルＤＮＡにおいて優れた効果を発揮する。複数の生物ゲノムを含むサンプルの例としては、例えば、環境サンプル、発酵槽サンプル、又はそれらの集積培養

サンプルが挙げられる。また、ステップ（ａ）において、複数のサンプルＤＮＡの各々を発現ベクターに導入し、サンプルＤＮＡライブラリーを作製してもよい。

【００１２】

レポーター遺伝子としては、例えば、蛍光タンパク質をコードする遺伝子、酵素をコードする遺伝子、及び宿主細胞が天然には有しない細胞表面抗原をコードする遺伝子が挙げられる。ここで蛍光タンパク質としては、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）が挙げられる。

【００１３】

レポーター遺伝子の発現は、例えば、上記蛍光タンパク質の蛍光に基づいて又は上記細胞表面抗原に対する抗体を用いて、例えばフローサイトメトリーの原理を利用して検出することができる。

【００１４】

また上記単離方法においては、ステップ（ｃ）及び（ｄ）における宿主細胞の培養を、通常用いられる培地濃度の１／１００～１／５の濃度の培地を用いて行うことが好ましい。

【００１５】

さらに上記単離方法は、ステップ（ｅ）で単離したサンプルＤＮＡをプローブとして用いることにより、又は単離したサンプルＤＮＡの塩基配列に基づいてプライマー又はプローブを設計することにより、該プライマー又はプローブを用いてサンプルＤＮＡの周辺に存在する遺伝子又は遺伝子断片を単離するステップをさらに含んでもよい。

【００１６】

本発明はまた、プロモーター、レポーター遺伝子、及び該プロモーターと該レポーター遺伝子との間にサンプルＤＮＡを挿入するためのクローニング部位を有する、上記単離方法に使用するための発現ベクターである。

【００１７】

上記発現ベクターとしては、限定するものではないが、配列番号１に示す配列を有するものが挙げられる。

【００１８】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

１．概要

本発明は、特定の基質の存在下における誘導的遺伝子発現を利用することにより、代謝系遺伝子及びその発現制御因子を単離（クローニング）する方法に関する。多くの場合、代謝系遺伝子は、基質となる化合物や反応生成物の存在に依存して誘導的に発現される。また、代謝系遺伝子の近傍に該遺伝子の発現制御に関与する因子（発現制御因子）が存在している。従って、本発明においては、サンプルＤＮＡをレポーター遺伝子の上流に挿入して細胞に導入し、特定の基質の存在下にて誘導的に発現されるレポーター遺伝子の発現を検出する。すなわち、特定の基質の存在下でレポーター遺伝子の発現が検出された場合には、その細胞に導入したサンプルＤＮＡは、該基質によって誘導される代謝系遺伝子及びその発現制御因子の全長又は一部を含むことになる。このように、サンプルＤＮＡの制御によるレポーター遺伝子の発現の有無を検出することによって、宿主の細胞内で発現させることが難しいタンパク質であっても、その発現制御因子をスクリーニングすることが可能になる。また、単離した発現制御因子の塩基配列に基づいて設計されたプライマー又はプローブを用いることにより、目的とする代謝系遺伝子を容易にスクリーニングすることが可能となる。プローブには、単離した発現制御因子のＤＮＡ断片をそのまま用いてもよい。

【００１９】

また、本発明においては、レポーター遺伝子の上流に配置されたサンプルＤＮＡ用クローニングサイトのさらに上流にプロモーターが配置された発現ベクターを使用する。これにより、スクリーニングの過程において、サンプルＤＮＡが挿入されないままセルフライゲーションしたベクターを排除することが容易になる。すなわち、サンプルＤＮＡが挿入されたベクターではレポーター遺伝子はサンプルＤＮＡの制御下に置かれ、サンプルＤＮＡ

が発現する条件下（すなわちサンプルＤＮＡが代謝系遺伝子の発現制御因子であるとき）においてのみレポーター遺伝子が発現される。一方、セルフライゲーションしたベクターでは、レポーター遺伝子は該プロモーターの制御下に置かれ、該プロモーターの誘導によりレポーター遺伝子が発現されることになる。したがって、宿主細胞を該プロモーターが誘導される条件下で培養し、レポーター遺伝子が発現している細胞を除去することにより、セルフライゲーションしたベクターを含む宿主細胞を除去することが可能になる。

【００２０】

本発明の方法において、単離しようとする「代謝系遺伝子」としては、特定の基質（化合物、生体分子など）の化学的構造の変換を触媒する酵素（代謝系酵素ともいう）をコードする遺伝子が含まれる。そのような代謝系遺伝子としては、例えば、フェノールの芳香環に酸素分子由来の酸素原子を導入しカテコールを生成する酵素「フェノール水酸化酵素（ｐｈｅｎｏｌ ｈｙｄｒｏｘｙｌａｓｅ）ＥＣ １．１４．１３．７」（Ｎｏｒｄｌｕｎｄ, Ｉ．ｅｔ ａｌ．, Ｃｏｍｐｌｅｔｅ ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｎｄ ｐｏｌｙｐｅｐｔｉｄｅ ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ ｍｕｌｔｉｃｏｍｐｏｎｅｎｔ ｐｈｅｎｏｌ ｈｙｄｒｏｘｙｌａｓｅ ｆｒｏｍ Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｓｐ．ｓｔｒａｉｎ ＣＦ６００．Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１９９０ １７２：６８２６－６８３３）が挙げられる。さらに、ハイドラーゼ、エステラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、β－ガラクトシダーゼ、ラクターゼ、ポリガラクツロナーゼ、β－グルコアミラーゼ、エステラーゼ、ヘミセルラーゼ、ペルオキシダーゼ、オキシダーゼ、オキシゲナーゼ、ラッカーゼ、グルコースオキシダーゼ、ペクチナーゼ、アミラーゼ、ガラクタナーゼ、アラビナーゼ、キシラナーゼ又はセルラーゼなども含まれるが、これらに限定されるものではない。

【００２１】

上記の代謝系酵素をコードする遺伝子に加え、「代謝系遺伝子」には、代謝反応において基質となる化学物質の細胞内外への輸送に関与するタンパク質をコードする遺伝子も含まれる。例えば、このような代謝系遺伝子としては、トルエンなどの化学物質の取り込みに関与するタンパク質ＸｙｌＮ（Ｋａｓａｉ, Ｙ．ｅｔ ａｌ．, Ｔｈｅ ＴＯＬ ｐｌａｓｍｉｄ ｐＷＷ０ ｘｙｌＮ ｇｅｎｅ ｐｒｏｄｕｃｔ ｆｒｏｍ Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｐｕｔｉｄａ ｉｓ ｉｎｖｏｌｖｅｄ ｉｎ ｍ－ｘｙｌｅｎｅ ｕｐｔａｋｅ．Ｊ Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．２００１ １８３：６６６２－６）などが挙げられる。また、トルエンなどの溶媒分子の細胞外への排出に関与するタンパク質である排出ポンプ（Ｄｕｑｕｅ, Ｅ．, ｅｔ ａｌ．, Ｇｌｏｂａｌ ａｎｄ ｃｏｇｎａｔｅ ｒｅｇｕｌａｔｏｒｓ ｃｏｎｔｒｏｌ ｔｈｅ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ｏｒｇａｎｉｃ ｓｏｌｖｅｎｔ ｅｆｆｌｕｘ ｐｕｍｐｓ ＴｔｇＡＢＣ ａｎｄ ＴｔｇＤＥＦ ｏｆ Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｐｕｔｉｄａ．Ｍｏｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．２００１ ３９：１１００－６）なども含まれる。

【００２２】

さらに本発明の方法は、上記代謝系遺伝子の発現制御因子を単離することをも目的とする。「発現制御因子」とは、特定の基質の存在下にて代謝系遺伝子が誘導的に発現される場合にその発現を制御する遺伝的要素を指す。原核生物では、互いに関連した働きをおこなうタンパク質をコードする構造遺伝子がクラスターを形成している場合が多く、代謝経路を構成するすべての酵素群をコードする遺伝子がクラスターを形成し、その発現が協調的に調節されていることがよくある。クラスター中にはクラスター自体の転写制御をおこなうような調節遺伝子が存在しており、このような調節遺伝子はクラスターを構成している酵素群の代謝産物等を誘導物質として利用し、クラスターの発現制御をおこなっている。またこの調節遺伝子はクラスターの転写制御にトランスに働く（例えば、Ｖｅｌａｓｃｏ, Ａ．ｅｔ ａｌ．, Ｇｅｎｅｔｉｃ ａｎｄ ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ ｔｈｅ ｓｔｙｒｅｎｅ ｃａｔａｂｏｌｉｃ ｃｌｕｓｔｅｒ ｏｆ Ｐｓｕｄｏｍｏｎａｓ ｓｐ．ｓｔｒａｉｎ Ｙ２．Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１９９８ １８０：１０６３－１０７１．を参照されたい）。本発明においては特にこ

のような調節遺伝子を目的の発現制御因子とすることが好ましい。そのような発現制御因子としては、例えば、ＸｙｌＲ、ＸｙｌＳ、ＤｍｐＲ、ＰｈｃＲなどが挙げられる。

【００２３】

上述したように、本発明の方法は、レポーター遺伝子の発現を利用して上記の代謝系遺伝子及びその発現制御因子を単離する。本発明の単離方法における各ステップについて以下に詳細に説明する。

【００２４】

２．発現ベクターの作製と宿主細胞への導入

本発明の方法においては、サンプルからサンプルＤＮＡを調製し、このサンプルＤＮＡを発現ベクターに導入してＤＮＡライブラリーを作製する。その後、作製したＤＮＡライブラリーの発現ベクターを宿主細胞に導入する。

【００２５】

（２－１）サンプルＤＮＡの調製

サンプルとしては、生物に由来するＤＮＡが含まれるサンプルであれば特に限定されず、単離された生物のサンプル（例えば微生物、微生物混合物など）、環境サンプル（例えば、土壌、湖沼水、海水、河川水など）、微生物の培養物、発酵槽内容物、集積培養物、培養細胞などが挙げられる。本発明は、特に、複数の生物のゲノムを含むサンプルに有効であり、そのようなサンプルの例としては、環境サンプル、発酵槽内容物、それらの集積培養物などが挙げられる。

【００２６】

サンプルからＤＮＡを抽出するには、当該技術分野で公知のあらゆる手法を用いることができる。例えば、フェノール・クロロホルム法等によりＤＮＡを調製することができる。また例えば、土壌中からメタゲノム（環境中に存在する雑多な生物（特に微生物）に由来するゲノムの集合）をクローニングする方法が記載されており、この文献に記載の手法も本発明において用いることができる（Ｒｏｎｄｏｎ，　ＭＲ．　ｅｔ　ａｌ．，　Ａｐｐｌ　Ｅｎｖｉｒｏｎ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．　２０００，　６６：２５４１－２５４７）。

【００２７】

また本発明においては、通常、抽出したＤＮＡを制限酵素等によって断片化して、それぞれをサンプルＤＮＡとして発現ベクターに導入する（ショットガン法）。

【００２８】

ショットガン法は、一般的に大きなサイズのＤＮＡの配列決定に用いられている手法であり、当技術分野では周知である（例えば、Ｓ．Ｂ．プリムローズ著，藤山監訳，「ゲノム解析ベーシック」，第３章，１９９６年，シュプリンガー・フェアラーク東京，を参照されたい）。この手法を利用して、発現ベクター中に導入するために適したサイズのサンプルＤＮＡを調製することも可能である。なお、本発明において、サンプルＤＮＡとして適したサイズは、１～２０ｋｂであり、好ましくは２～１０ｋｂであり、さらに好ましくは５～８ｋｂである。

【００２９】

（２－２）発現ベクターの構築とサンプルＤＮＡライブラリーの作製

発現ベクターは、上述したように調製したサンプルＤＮＡを、該サンプルＤＮＡがプロモーターとレポーター遺伝子との間に挿入されるように導入して構築する。すなわち、サンプルＤＮＡが挿入された場合には、レポーター遺伝子がサンプルＤＮＡの制御下に置かれるようになる。この場合、プロモーターとレポーター遺伝子を含む発現ベクターにサンプルＤＮＡを挿入する方法が一般的であるが、プロモーター、サンプルＤＮＡ及びレポーター遺伝子をこの順序で連結して適当なベクターに導入してもよい。このように発現ベクターに各配列を挿入する手法は当技術分野で周知である。

【００３０】

使用する発現ベクターは、後述する宿主細胞に応じて、該宿主細胞内で自律的に増殖可能なファージ又はプラスミドなどから適当なものを選択する。例えば、プラスミドＤＮＡと

しては、大腸菌由来のプラスミド（例えばｐＵＣ１８、ｐＵＣ１９等）、枯草菌由来のプラスミド（例えばｐＵＢ１１０、ｐＴＰ５等）、酵母由来のプラスミド（例えばＹＥｐ１３、ＹＥｐ２４、ＹＣｐ５０等）などが挙げられ、ファージＤＮＡとしてはλファージ（λｇｔ１０、λｇｔ１１、λＺＡＰ等）が挙げられる。

【００３１】

プロモーターは、使用する発現ベクターの種類及び宿主細胞に応じて適当なものを発現ベクター中に挿入する。例えば宿主細胞中で発現可能なプロモーターとして、ｔｒｐプロモーター、ｌａｃプロモーター、P_Lプロモーター、P_Rプロモーターなどの大腸菌やファージに由来するプロモーター、並びに、例えばＧＡＬ１プロモーター、ＧＡＬ１０プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、ＭＦα１プロモーター、ＰＨＯ５プロモーター、ＰＧＫプロモーター、ＧＡＰプロモーター、ＡＤＨプロモーター、ＡＯＸ１プロモーター等が用いられる。ｔａｃプロモーターなどのように、人為的に設計改変されたプロモーターを用いてもよい。

【００３２】

本発明において、レポーター遺伝子とは、分子生物学の分野において調節配列の機能の決定に一般的に用いられている遺伝子を指し、蛍光タンパク質、酵素、細胞表面抗原などをコードする遺伝子が含まれる。具体的には、限定するものではないが、レポーター遺伝子としては、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）をコードするｇｆｐ遺伝子、ルシフェラーゼをコードするｌｕｃ遺伝子、βガラクトシダーゼをコードするｌａｃＺ遺伝子などが挙げられる。

【００３３】

本発明においては、レポーター遺伝子として蛍光タンパク質をコードする遺伝子を用いることが好ましい。この場合には、フローサイトメトリーの原理を利用したソーティング法（例えば、ＦＡＣＳ：ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ ａｃｔｉｖａｔｅｄ ｃｅｌｌ ｓｏｒｔｉｎｇ）を用いて、複数の宿主細胞の各々におけるレポーター遺伝子の発現を迅速に検出し、発現の有無によって細胞を分画することができるため、高効率なスクリーニングが可能になる。すなわち、例えばＤＮＡライブラリーの発現ベクターを導入した宿主細胞をプレート培養によりコロニー化して個々に単離した後にスクリーニングするのではなく、液体培養した複数の宿主細胞を混合状態のままＦＡＣＳに供し、レポーター遺伝子を発現する細胞をソーティングにより分画することができる。

【００３４】

本発明者らは、レポーター遺伝子として緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）をコードする遺伝子を利用する場合に用いるためのショットガンクローニングベクターとして、ｐ１８ＧＦＰを構築した。図１にその全配列を、図２にその構造を示す。ｐ１８ＧＦＰは、ｐＵＣ１８（タカラバイオ）のｌａｃプロモーターの下流に変異型ｇｆｐ遺伝子（具体的にはＦ９９Ｓ，Ｍ１５３Ｔ，Ｖ１６３Ａ；Ｓａｋｉｋａｗａ Ｃ．ｅｔ ａｌ．，Ｏｎ ｔｈｅ ｍａｘｉｍｕｍ ｓｉｚｅ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｔｏ ｓｔａｙ ａｎｄ ｆｏｌｄ ｉｎ ｔｈｅ ｃａｖｉｔｙ ｏｆ ＧｒｏＥＬ ｕｎｄｅｒｎｅａｔｈ ＧｒｏＥＳ．Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．１９９９．２７４：２１２５１－２１２５６）を挿入し、ＧＦＰの発現がイソプロピル１－チオ－β－Ｄ－ガラクトシド（ＩＰＴＧ）によって誘導されるように構築したものであり、さらに、このｇｆｐ遺伝子の上流のマルチプルクローニングサイト（ＭＣＳ）に挿入されるサンプルＤＮＡの配列がＧＦＰとの融合タンパク質として発現されないように、ｇｆｐ遺伝子の上流に各コドンの読み枠に対応した終止コドンを挿入している（図１及び２）。従って、本発明の発現ベクターを用いて本発明の単離方法を行う場合には、該発現ベクターのマルチクローニングサイト（ＭＣＳ）にサンプルＤＮＡを挿入するのみでよい。しかし、本発明の方法において利用可能な発現ベクターは上記のものに限定されない。

【００３５】

また本発明の別の実施形態においては、レポーター遺伝子として、宿主細胞が天然には有しない細胞表面抗原をコードする遺伝子を利用することも可能である。細胞表面抗原とは

、細胞の膜表面上に存在するその細胞に特有の物質を指し、この物質に対する特異的抗体を用いると、機能又は形態が異なる他の細胞と区別して目的の細胞を検出することができる。例えば細胞表面抗原としては、限定されるものではないが、大腸菌のＦｉｍ、Ｐａｐ、Ｓｆａ、Ｆａｅ、Ｆａｎなどが挙げられる。従って、本発明においては、宿主細胞が天然には有しない細胞表面抗原をレポーター遺伝子として用いて、該レポーター遺伝子の発現を該細胞表面抗原に対する抗体により検出してもよい。この場合には、細胞表面抗原を発現する宿主細胞を、例えば、該抗原に対する抗体を固定化した担体などを用い、抗体に結合する細胞を回収することにより選別することができる。あるいは、その抗体を、検出可能な標識（例えば蛍光タンパク質、酵素など）で直接又は間接的に標識し、標識した抗体を利用して、該抗体と結合する細胞を回収することにより、細胞表面抗原を発現する細胞を選別することもできる。

【００３６】

さらに本発明の別の実施形態においては、レポーター遺伝子として、酵素をコードする遺伝子を利用することも可能である。この場合、レポーター遺伝子にコードされる酵素が、検出可能な物質を検出不可能な物質に変換するか、又はその逆に検出不可能な物質を検出可能な物質に変換するものであることが望ましい。例えばそのような酵素としては、βガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、リパーゼ、モノオキシゲナーゼ、ペルオキシダーゼなどが挙げられる。これにより、例えばＦＡＣＳを用いて、検出可能な物質を含む細胞と検出不可能な物質を含む細胞をそれぞれ分画することにより、レポーター遺伝子を発現する細胞を高効率に選別できるようになる。

【００３７】

発現ベクターは、プロモーター、サンプルＤＮＡ及びレポーター遺伝子の各配列が機能するように構築する必要があり、そのような発現ベクターの構築は当業者に周知である。例えば、発現ベクターには、プロモーター、サンプルＤＮＡ及びレポーター遺伝子のほか、所望によりエンハンサーなどのシスエレメント、スプライシングシグナル、ポリＡ付加シグナル、選択マーカー、リボソーム結合配列（ＳＤ配列）などを連結することができる。なお、選択マーカーとしては、例えばジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等が挙げられる。

【００３８】

以上のようにして、各々のサンプルＤＮＡが導入された発現ベクターを構築し、サンプルＤＮＡのライブラリーを作製する。

【００３９】

（２－３）発現ベクターの宿主細胞への導入

（２－２）の項に従って作製した発現ベクター又はサンプルＤＮＡライブラリーの各発現ベクターを、宿主細胞へ導入する。

【００４０】

本発明において使用可能な宿主細胞としては、プロモーターの制御下にてレポーター遺伝子を発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、宿主細胞としては、細菌（大腸菌、枯草菌等）、酵母などが挙げられる。

【００４１】

その他、形質転換に一般的に用いられる動物細胞及び植物細胞も宿主細胞として使用することができ、このような宿主細胞を用いた形質転換手法は当技術分野で周知である。以下に宿主細胞として細菌及び酵母を使用した場合について詳細に記載するが、本発明はこれらの宿主細胞に限定されるものではない。

【００４２】

細菌を宿主とする場合、大腸菌としては、例えばエッシェリヒア・コリ（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）ＪＭ１０９株、ＤＨ５α株などが挙げられ、枯草菌としては、例えばバチルス・ズブチリス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ）などが挙げられる。細菌への発現ベクターの導入方法は、細菌にＤＮＡを導入する方法であれば特に限定されるものではない。例えばカルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法等が挙

げられる。
【００４３】
酵母を宿主とする場合は、例えばサッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）、シゾサッカロミセス・ポンベ（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｐｏｍｂｅ）などが用いられる。酵母への発現ベクターの導入方法は、酵母にＤＮＡを導入する方法であれば特に限定されず、例えばエレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等が挙げられる。
【００４４】
上述のように発現ベクターを宿主細胞に導入する操作を行った後、実際に宿主細胞に発現ベクターが導入されている細胞について選択を行う。具体的には、例えば選択マーカーを指標にして導入細胞（形質転換細胞）を選択することができる。
【００４５】
３．細胞の選択
本発明の方法においては、「２．発現ベクターの作製と宿主細胞への導入」の項に従って得られた宿主細胞に対し、以下の３段階のスクリーニングを行うことにより、目的とする代謝系遺伝子及びその発現制御因子を含む細胞を採取する。この３段階のスクリーニングには、（１）セルフライゲーションベクターを保持する細胞の除去、（２）特定基質の非存在下でレポーター遺伝子を発現する細胞の除去、及び（３）特定基質存在下にて誘導的にレポーター遺伝子を発現する細胞の採取、が含まれる。スクリーニングの順序は特に限定されないが、（１）のスクリーニングを１段階目のスクリーニングとして行うことが望ましい。（２）及び（３）のスクリーニング段階の順序も特に限定されるものではないが、（２）のスクリーニングを２段階目に、（３）のスクリーニングを３段階目に行うことが望ましい。また、（１）及び（２）のスクリーニングを合わせて一つのステップとすることも可能である。
【００４６】
本発明においてスクリーニングとは、代謝系遺伝子の発現制御因子を単離することを目的として、宿主細胞に導入された発現ベクターがその目的配列を含むか否かを検出し、それを含むと推測される細胞を選別し、それを含まないと推測される細胞を排除するための操作をいう。
【００４７】
全てのスクリーニング段階において、細胞の除去又は選別は、レポーター遺伝子の発現に基づいて行う。レポーター遺伝子の発現の検出は、レポーター遺伝子の種類及び細胞の種類に応じて異なるが、多数の検出手段及び手法が当技術分野で周知である（例えば、「分子生物学実験プロトコールＩＩ」，西郷及び佐野訳，１９９７年，丸善株式会社を参照されたい）。
【００４８】
例えばレポーター遺伝子として蛍光タンパク質をコードする遺伝子を用いた場合には、レポーター遺伝子の発現をその蛍光に基づいて検出することができる。従って、レポーター遺伝子を発現する細胞は、例えば、フローサイトメーターを利用するソーティング法（ＦＡＣＳなど）を用いて、迅速に選別し回収することが可能である。ＦＡＣＳを用いると、複数のサンプルＤＮＡ（サンプルＤＮＡライブラリー）をそれぞれ導入した細胞集団を液体培地中の混合状態のままで個々の細胞の蛍光を検出することができ、従って個々の細胞のレポーター遺伝子の発現を高効率に検出し、かつ選別することができる。
【００４９】
また、レポーター遺伝子として、宿主細胞が天然には有しない細胞表面抗原をコードする遺伝子を用いた場合には、該細胞表面抗原に対する抗体を用いてレポーター遺伝子の発現を検出することができる。上述したように、細胞表面抗原を発現する宿主細胞は、例えば、該抗原に対する抗体を固定化した担体などを用い、抗体に結合する細胞を回収することにより選別することができる。あるいは、その抗体を、検出可能な標識（例えば蛍光タンパク質、酵素など）で直接又は間接的に標識し、標識した抗体を利用して、該抗体と結合

する細胞を回収することにより、細胞表面抗原を発現する細胞を選別することもできる。
【００５０】
さらに、レポーター遺伝子として、酵素をコードする遺伝子を用いた場合には、該酵素により検出可能な物質が検出不可能な物質に変換されるか、又はその逆に検出不可能な物質が検出可能な物質に変換されることとなるため、そのような物質の存在を検出することにより、レポーター遺伝子の発現を検出することができる。例えばＦＡＣＳを用いて、検出可能な物質を含む細胞と検出不可能な物質を含む細胞をそれぞれ分画することにより、レポーター遺伝子を発現する細胞を高効率に選別できる。
【００５１】
上述したＦＡＣＳとは、蛍光活性化セルソーティングの略であり、当業者に周知である。また、ＦＡＣＳを行うための装置であるセルソーターも公知であり、種々の機能を有するＦＡＣＳ用セルソーターが市販されている。
【００５２】
ＦＡＣＳのセルソーターの原理は、混合状態の細胞を１個ずつレーザー光の中心を通過させ、細胞がレーザー光中を通過するときに発する蛍光及び散乱光を検出し、それらの光を各種の電気パルス、続いてシグナル情報に変換し、目的とする細胞に関するヒストグラム解析とリストモードデータ解析を行って、その結果に基づいて細胞の分取を行う、というものである。そのため、セルソーターは、フローセルと細胞分取装置とを備えており、蛍光や散乱光のシグナル情報の測定結果を、例えばドットプロットとして表示する機能を有しており、また特定のシグナル情報を発する細胞を細胞分取装置により分取することができる。
【００５３】
セルソーターは、生細胞を高い生存率でかつ無菌的に分取することができるため、当技術分野で広く利用されている。セルソーター解析についての詳細な説明に関しては、例えば、「動物細胞培養の実際」（１９９０年，三井洋司監訳，丸善株式会社）、「フローサイトメトリーの原理入門」（ベックマン・コールター株式会社，サイトメトリーグループホームページ，ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｂｃ－ｃｙｔｏｍｅｔｒｙ．ｃｏｍ／ａｄｄ＿ｐａｇｅ／ｆｃｍｐｒｉｎ．ｈｔｍｌ）を参照されたい。
【００５４】
本発明において利用可能なセルソーターは、上述したようなフローセルと細胞分取装置とを備えるものであれば特に限定されず、例えば、ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒ（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ製）、ＦＡＣＳＶａｎｔａｇｅ　ＳＥ（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ製）などが挙げられる。セルソーターは、製造業者の取扱説明書に従って取り扱い、解析を行う。
【００５５】
また、本発明の方法においてスクリーニング段階を行う際の細胞培養条件について説明する。多くの代謝系遺伝子の誘導的発現は、通常の実験に用いられる有機培地、例えばＬＢ培地（Ｊ Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｆｉｔｓｃｈ ＥＦ，Ｍａｎｉａｔｉｓ Ｔ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ １９８９）中では起こりにくい可能性があることが示唆されている（Ｓｚｅ ＣＣ ｅｔ ａｌ．，Ｇｒｏｗｔｈ ｐｈａｓｅ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ｓｉｇｍａ（５４）－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ Ｐｏ ｐｒｏｍｏｔｅｒ ｃｏｎｔｒｏｌｌｉｎｇ ｔｈｅ Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ－ｄｅｒｉｖｅｄ （ｍｅｔｈｙｌ）ｐｈｅｎｏｌ ｄｍｐ ｏｐｅｒｏｎ ｏｆ ｐＶＩ１５０．Ｊ Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１９９６ １７８：３７２７－３５）。そこで、本発明者らは、特定の基質による誘導的遺伝子発現を最大化するための検討を重ね、大腸菌などの細菌を用いた場合に、通常用いられる培地濃度より１／１００から１／５程度に希釈された培地で組換え宿主細胞を培養することが望ましいという知見を得た。この手法は、未知の代謝系遺伝子を獲得しようとする場合にはその誘導的遺伝子発現が増強されるため、有用

であると考えられる。従って、本発明の単離方法においては、通常濃度より希釈された培地、例えば通常濃度の約１／１００～１／５、好ましくは１／５０～１／１０の濃度の培地を使用して後述するスクリーニングを行い、細胞を選別する。ここで、「通常用いられる培地濃度」とは、形質転換した宿主細胞の培養に採用される培地の濃度を指し、このような培地濃度は当業者に周知である。

【００５６】

また、「通常用いられる培地濃度」における「濃度」とは、炭素源となり得る基質の濃度のことを意味する。したがって、「通常濃度より希釈された培地」とは、通常用いられる培地よりも炭素源となり得る基質の濃度が低い培地のことを意味し、「通常濃度の約１／１００～１／５の濃度の培地」とは、炭素源となり得る基質の濃度を約１／１００～１／５とした培地のことをいう。なお、培地中に含まれる他の成分については、炭素源となり得る基質と同様に希釈されていてもよいし、希釈されていなくてもよい。

【００５７】

例えば、大腸菌を宿主細胞として使用する場合、大腸菌に通常用いられる培地としては、ＧＹＴ培地、ＬＢ培地、Ｍ９最少培地（Ｍ９　Ｍｉｎｉｍａｌ　Ｍｅｄｉｕｍ）、ＮＺＣＹＭ培地、ＮＺＹＭ培地、ＳＯＢ培地、ＳＯＣ培地、２×ＹＴ培地等が挙げられる。これらの培地の組成については、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ ａｎｄ Ｒｕｓｓｅｌｌ，Ｄ．Ｗ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ｍａｎｕａｌｓ ｔｈｉｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ Ｖｏｌｕｍｅ３，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，２００１，Ａ２．２－Ａ２．４に記載されている。上記培地の多くのものは炭素源としてイーストエクストラクト（酵母エキス）及びバクトペプトン（トリプトン）を含んでいるため、「通常濃度の約１／１００～１／５の濃度の培地」を調製するためには、イーストエクストラクト及びバクトペプトンの濃度を約１／１００～１／５とすればよい。また、Ｍ９最少培地は完全合成培地であるが、炭素源となる基質の濃度は０．４％である。これを基準とすれば、大腸菌における「通常用いられる培地」とは、炭素源となり得る基質を約０．４％含む培地であると考えることができ、「通常濃度の約１／１００～１／５の濃度の培地」とは、炭素源となり得る基質を約０．００４～０．０８％含む培地であるということができる。

【００５８】

具体的には、例えばＬＢ培地を使用する場合には、通常バクトペプトンは１０ｇ／ｌ、イーストエクストラクトは５ｇ／ｌの濃度で使用されるが、好ましくはこれらを１００分の１から２分の１、より好ましくは２０分の１から５分の１の濃度に希釈したＬＢ培地を使用する。そのような希釈したＬＢ培地としては、限定するものではないが、ｄＬＢ培地（バクトペプトン１ｇ／ｌ、イーストエクストラクト０．５ｇ／ｌ）が報告されている（Ｈｉｎｏ，Ｓ．ｅｔ ａｌ．，Ｐｈｅｎｏｌ ｈｙｄｒｏｘｙｌａｓｅ ｃｌｏｓｅｄ ｆｒｏｍ Ｒａｌｓｔｏｎｉａ ｅｕｔｒｏｐｈａ ｓｔｒａｉｎ Ｅ２ ｅｘｈｉｂｉｔｓ ｎｏｖｅｌ ｋｉｎｅｔｉｃ ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ，Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ，１９９８，１４４：１７６５－１７７２）。一方で、通常の濃度の実験用培地でも誘導的発現に影響のない代謝系遺伝子も存在するので、場合によっては希釈培地を用いる必要はない。

【００５９】

（３－１）セルフライゲーションベクターを保持する細胞の除去

スクリーニングの最初の段階として、サンプルＤＮＡが発現ベクターに導入されず、セルフライゲーションした発現ベクターを有する宿主細胞を除去する。セルフライゲーションした発現ベクターの発現は、発現ベクターの導入後、発現ベクターに配置したプロモーターがレポーター遺伝子の発現を誘導するような条件下で宿主細胞を培養した後、レポーター遺伝子の発現を検出することにより確認することができる。たとえば、ｌａｃプロモーターを使用した場合には、宿主細胞をイソプロピル１－チオ－β－Ｄ－ガラクトシド（ＩＰＴＧ）の存在下で培養することにより、セルフライゲーションした発現ベクターのレポーター遺伝子の発現を誘導することができる。ここで、ベクターのセルフライゲーション

とは、発現ベクターの構築の際に、サンプルＤＮＡが挿入されず、ベクター内で連結して環を形成することを指し、ベクターの構築においては高頻度でセルフライゲーションが起こることが知られている。このようにセルフライゲーションした発現ベクターにおけるレポーター遺伝子は、元々発現ベクターに含まれるプロモーターの制御下に配置されることになり、その結果、サンプルＤＮＡが挿入されていなくてもレポーター遺伝子が発現することとなる。本発明においては、プロモーターの制御下に配置されたレポーター遺伝子を含む発現ベクターを利用し、セルフライゲーションしたベクターの存在をレポーター遺伝子の発現を利用して検出することによって、そのようなセルフライゲーションした発現ベクターを含む細胞を予め選別して除去した後、さらにスクリーニングを行う。

【００６０】

一方、発現ベクターとしてプロモーターを含まないベクターを使用した場合には、セルフライゲーションした発現ベクターのレポーター遺伝子はプロモーターの制御下にはなく発現しないように思われる。しかし、このような状態の発現ベクターを用いて実際に細胞に導入した場合であってもレポーター遺伝子の発現が多く観察されることがわかっている。このようなセルフライゲーションしたベクターを含む細胞は、後述する構成的にレポーター遺伝子を発現する細胞を除去するスクリーニング段階を行った後でも除去されないことが多いため、レポーター遺伝子を基質存在下で誘導的に発現する細胞を選別しようとする際に擬陽性として選別してしまう可能性がある。従って、例えば、誘導的な発現が弱い代謝系遺伝子の発現調節因子を単離しようとする場合には、このセルフライゲーションした発現ベクターを含む細胞がレポーター遺伝子を発現することにより、実際に目的とする代謝系遺伝子の発現調節因子を含む細胞を効率的に単離することが困難になる。

【００６１】

従って、本発明においては、セルフライゲーションした発現ベクターを含む細胞を除去するスクリーニング段階を行い、効率的かつ確実に代謝系遺伝子を単離することができるようにした。

【００６２】

（３－２）基質の非存在下でレポーター遺伝子を発現する細胞の除去

また別のスクリーニング段階として、基質の非存在下でレポーター遺伝子を発現する宿主細胞を除去する。本発明においては、代謝系遺伝子及びその発現制御因子を単離することを目的とするため、特定の基質の非存在下でレポーター遺伝子を発現させるサンプルＤＮＡはその目的の配列ではないと考えられる。従って、スクリーニング段階の１つとして、特定の基質の非存在下においてサンプルＤＮＡを発現する宿主細胞を選別し除去することが必要となる。具体的には、使用する宿主細胞に通常用いられる培養条件下にて、又は通常用いられる培養濃度よりも低減した濃度の培地を用いて、宿主細胞を培養し、レポーター遺伝子の発現を検出し、発現が検出された宿主細胞を選別し除去することにより行う。ここで、通常の細胞培養条件は、使用する宿主細胞及び培地に応じて異なるが、当業者であれば容易に理解することができる。なお、このスクリーニング段階で使用する培養条件は、特定の基質が非存在であるという点を除いて、後述する「（３－３）目的細胞の採取」の項のスクリーニングで使用する培養条件と同一にすることが望ましい。これは、該基質の有無以外の培養条件の変化による影響を抑えるためである。

【００６３】

なお、「（３－１）セルフライゲーションベクターを保持する細胞の除去」の項で述べたセルフライゲーションベクターを保持する細胞の除去に供した培養条件も、特定の基質の非存在下における培養条件であるということができる。したがって、特定の基質の非存在下でレポーター遺伝子を発現する細胞を除去する工程は、セルフライゲーションベクターを保持する細胞の除去する工程と同一の工程とすることもできるが、「（３－３）目的細胞の採取」の項に後述する目的とする発現制御因子を含む細胞の採取効率を上げるためには、本工程を別に行うことが望ましい。

【００６４】

（３－３）目的細胞の採取

別のスクリーニング段階においては、特定の基質の存在下にて誘導的にレポーター遺伝子を発現する宿主細胞を目的細胞として採取する。すなわち、このスクリーニング段階により、特定の基質の存在下において誘導的にレポーター遺伝子を発現する宿主細胞が採取されることになる。

【００６５】

特定の基質とは、どのような代謝系遺伝子及びその発現制御因子を単離しようとするかに応じて任意に選択することができる。例えば、代謝系遺伝子として酵素をコードする遺伝子を単離しようとする場合には、特定の基質は、その酵素の基質となる。基質の添加量及び培養条件などは当業者に公知であり、適宜適当なものを選択したり、種々の条件で実験を行った後で最適な条件を選択することも可能である。またここで採用する培養条件は、使用する宿主細胞に通常用いられる培養条件、又は通常用いられる培養濃度よりも低減した濃度の培地を用いる培養条件とすることができるが、レポーター遺伝子の発現を最大化するためには通常用いられる培養濃度よりも低減した濃度の培地を用いることが望ましい。ただし、レポーター遺伝子の発現を最大化する培地の濃度については、目的とする代謝系遺伝子の発現制御因子によって異なるため、必ずしも濃度を低減した培地を用いる必要はない。

【００６６】

上述した３段階のスクリーニング方法は、全てのスクリーニング段階を行うことが好ましい。また、それぞれの段階におけるスクリーニングを数回ずつ繰り返すことがより効果的である。

【００６７】

４．サンプルＤＮＡの単離

「３．細胞の選択」の項に記載のように採取された細胞は、該細胞に導入されたサンプルＤＮＡが代謝系遺伝子の発現制御因子を含むと考えられる。従って、採取された細胞に導入した発現ベクターからサンプルＤＮＡを単離することにより、目的とする代謝系遺伝子の発現制御因子を得ることができる。また、通常、発現制御因子の下流には代謝系遺伝子が存在しているため、本方法によって発現制御因子を単離することにより、その下流に存在する代謝系遺伝子の一部又は全長を得ることも可能である。

【００６８】

またさらに、上記単離したサンプルＤＮＡをプローブとして、又はサンプルＤＮＡの塩基配列を決定した配列情報に基づいてプローブ又はプライマーを設計し、該プライマー又はプローブを用いてポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）又はハイブリダイゼーション等の当技術分野で公知の手法を行うことにより、代謝系遺伝子の全長又はその一部を得たり、サンプルＤＮＡの周辺に存在する遺伝子又は遺伝子断片を単離することも可能である。

【００６９】

このようにして、代謝系遺伝子の全体やその近傍に存在する遺伝子を獲得でき、また代謝系遺伝子オペロンの全体構造を明らかにすることも可能になる。

【００７０】

さらにまた、上記３段階のスクリーニングにおいて、レポーター遺伝子が誘導的に発現されなかった細胞は、他の基質に対する代謝系遺伝子及びその発現制御因子を含む細胞を獲得するためのスクリーニングにも用いることができる。このようにして、一度作製された遺伝子ライブラリーは、様々な代謝系遺伝子のためのスクリーニングに使用できる。

【００７１】

また、本発明の単離方法は、代謝系遺伝子のみならず、特定の環境因子に対し応答して発現される環境応答遺伝子及びその発現制御因子のためのスクリーニングにも有効である。

【００７２】

本発明の単離方法は、単離された微生物のゲノムから特定の代謝系遺伝子を単離しようとする際に利用可能であることはもちろんのこと、巨大な環境メタゲノムから代謝系遺伝子を単離する場合に特に有効である。メタゲノムは、環境中の多様な微生物に由来するものであり、例えば土壌中には、数千種以上の異なる細菌が存在することが示唆されている（

Ｔｏｒｓｖｉｋ Ｖ．ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｋａｒｙｏｔｉｃ ｄｉｖｅｒｓｉｔｙ－ｍａｇｎｉｔｕｄｅ，ｄｙｎａｍｉｃｓ，ａｎｄ ｃｏｎｔｒｏｌｌｉｎｇ ｆａｃｔｏｒｓ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２００２ ２９６：１０６４－１０６６）。これを基に計算すると、メタゲノム由来のプラスミドベクターライブラリーを寒天プレート上のコロニーとして構築すれば、約１００万から１０００万個のコロニーを個々にスクリーニングすることが必要と考えられる。一方、本発明の単離方法に従って選別を行った場合には、スクリーニングは極めて効率的になる。例えば、上記メタゲノム由来のプラスミドベクター中から目的の代謝系遺伝子の発現制御因子を含むクローン（細胞）を選別する際にＦＡＣＳなどのフローサイトメーターを用いれば、１００万個のクローンライブラリーを蛍光強度に応じて選別するのに１０分を要しないため、非常に迅速かつ効率的であるといえる。

【００７３】

【実施例】

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明する。ただし、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【００７４】

〔実施例１〕発現ベクターの構築

初めに、本発明の方法を実施するために使用する発現ベクターｐ１８ＧＦＰの構築を行った。ｐ１８ＧＦＰは、図２に示すように、ｐＵＣ１８（タカラバイオ）のｌａｃプロモーターの下流にレポーター遺伝子としてｇｆｐ遺伝子を挿入し、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）の発現がイソプロピル１－チオ－β－Ｄ－ガラクトシド（ＩＰＴＧ）によって誘導されるように構築したもので、さらに、このｇｆｐ遺伝子の上流のマルチプルクローニングサイト（ＭＣＳ）に挿入されるサンプルＤＮＡによりコードされるタンパク質とＧＦＰとが融合タンパク質として発現されないように、ｇｆｐ遺伝子の上流に各コドンの読み枠に対応した終止コドンを挿入した（図１及び２）。このｐ１８ＧＦＰによって形質転換された大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉＪＭ１０９）が、ＩＰＴＧの存在下でＧＦＰを発現するか否かをフローサイトメトリーにより確認したところ、蛍光検出器において非常に強い蛍光を検出できた（図３、灰色）。一方、ｐＵＣ１８によって形質転換された大腸菌は、ほとんど蛍光を発しないことも確認した（図３、黒色）。

【００７５】

〔実施例２〕フェノール分解菌Ｒａｌｓｔｏｎｉａ ｅｕｔｒｏｐｈａＥ２株のフェノール水素化酵素遺伝子のクローニング

本実施例においては、本発明の単離方法の有効性（目的の代謝系遺伝子が獲得できるか否か）を実証するために、既知のフェノール水素化遺伝子（ｐｏｘ遺伝子［Ｈｉｎｏ，Ｓ．ｅｔ ａｌ．，Ｐｈｅｎｏｌ ｈｙｄｒｏｘｙｌａｓｅ ｃｌｏｎｅｄ ｆｒｏｍ Ｒａｌｓｔｏｎｉａ ｅｕｔｒｏｐｈａ ｓｔｒａｉｎ Ｅ２ ｅｘｈｉｂｉｔｓ ｎｏｖｅｌ ｋｉｎｅｔｉｃ ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ １９９８ １４４：１７６５－７２．］）がクローニングされているフェノール分解菌Ｒａｌｓｔｏｎｉａ ｅｕｔｒｏｐｈａ Ｅ２株を用いた実験を行った。すなわち、Ｅ２株ゲノムライブラリーから、本発明の方法に従ってｐｏｘ遺伝子の単離を試みた。

【００７６】

Ｅ２株からの染色体ＤＮＡの抽出は、Ｓｉｌｈａｖｙらの方法（Ｓｉｌｈａｖｙ ＴＪ ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔｓ ｗｉｔｈ ｇｅｎｅ ｆｕｓｉｏｎｓ．Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．１９８４）によりおこなった。抽出したＤＮＡをＳａｕ ３ＡＩにより部分分解し、０．５％アガロースゲル中で電気泳動した。５～８ｋｂの大きさの染色体ＤＮＡ断片をＱＩＡｑｕｉｃｋ ｇｅｌ ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）によりゲル中から抽出した。抽出した染色体ＤＮＡ断片は、Ｂａｍ ＨＩで切断したｐ１８ＧＦＰ内に挿入した。これを用いてエレクトロポレーションによりＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉＪＭ１０９（タカラバイオ）を形質転換し、全体で約２

５，０００個の独立したクローン（プレート培養により出現したアンピシリン耐性コロニー数から計算した）を取得し、これを５ｍｌのＬＢ液体培地にまとめて植菌した（以下、このライブラリーを「Ｒａｌｓｔｏｎｉａライブラリー」という）。ＬＢ液体培地には、ｌａｃプロモーターによる誘導をかけるため、ＩＰＴＧを終濃度０．５ｍＭとなるように添加した。

【００７７】

一晩培養後、フローサイトメーターを用いて、セルフライゲーションしたベクターを保持する細胞を除去するためのスクリーニングを行った。これには、フローサイトメーターＦＡＣＳＶａｎｔａｇｅ ＳＥ（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）と付属するアルゴンレーザー（レーザー波長４８８ｎｍ）を用いた。シース液は１．５倍濃度のＰＢＳ溶液（Ｓｉｌｈａｖｙ ＴＪ ｅｔ ａｌ．, Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔｓ ｗｉｔｈ ｇｅｎｅ ｆｕｓｉｏｎｓ．Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ, Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ, Ｎ．Ｙ．１９８４）を使用した。これにより、ＧＦＰを発現していない細胞のみ約５００，０００個を回収した。

【００７８】

回収した菌懸濁液を希釈培地のｄＬＢ培地（Ｈｉｎｏ Ｓ．ｅｔ ａｌ．, Ｐｈｅｎｏｌ ｈｙｄｒｏｘｙｌａｓｅ ｃｌｏｎｅｄ ｆｒｏｍ Ｒａｌｓｔｏｎｉａ ｅｕｔｒｏｐｈａ ｓｔｒａｉｎ Ｅ２ ｅｘｈｉｂｉｔｓ ｎｏｖｅｌ ｋｉｎｅｔｉｃ ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ １９９８ １４４：１７６５－７２）に植菌し、一晩培養後、上記のスクリーニングと同様に非発現株を選別するスクリーニング段階を行った（構成的に発現が誘導される遺伝子を含有するベクターを保持する細胞の除去）。ｄＬＢ培地の有機物濃度は、ＬＢ培地の１／１０（すなわち、ｄＬＢ培地の組成は、ポリペプトン１ｇ／ｌ、イーストエクストラクト０．５ｇ／ｌ、ＮａＣｌ １ｇ／ｌ、マルトース２ｇ／ｌ、$MgSO_4$ １０ｍＭ）とした。

【００７９】

上記スクリーニングで回収した菌懸濁液を終濃度２ｍＭのフェノールを含むｄＬＢ培地で一晩培養し、誘導発現する遺伝子を含有するベクターを保持する細胞を選別するために、フローサイトメーターを用いて、フェノールに依存してＧＦＰ蛍光を発現するクローンを約４，０００個回収した。回収した細胞の一部を、ＩＰＴＧを含んだＬＢ培地プレートに塗布した。プレート上でＧＦＰを発現していないと考えられるコロニーを２４個選択し、フェノール添加又は非添加のｄＬＢ培地を用いて培養し、ＧＦＰ蛍光の発現をフローサイトメーターにより確認した（図４、Ａ及びＢ）。その結果、２４個のうち、フェノールによってＧＦＰの発現誘導が確認されたものは３個あった。クローン化されたＤＮＡ断片の塩基配列を決定したところ、これらはすべてｐｏｘオペロンを含んでいることが確認された。以上より、本発明の方法により目的の代謝系遺伝子が高効率に得られることが確認できた。

【００８０】

〔実施例３〕新規３－クロロ安息香酸代謝系遺伝子のクローニング

本実施例においては、本発明の方法に従って、特定の基質の存在下で誘導的に発現される新規な遺伝子を実際に単離することができるか否かを確認するための実験を行った。

【００８１】

最初に、実施例２において３段階目のスクリーニング後にＧＦＰ蛍光を発現しないものとして分画された非発現クローンを準備した。この菌懸濁液を終濃度２ｍＭの３－クロロ安息香酸を含むｄＬＢ培地で一晩培養し、フローソーティングにより３－クロロ安息香酸に依存してＧＦＰ蛍光を発現するクローンを約４，０００個回収した。回収した細胞の一部を、ＩＰＴＧを含んだＬＢ培地プレートに塗布した。プレート上でＧＦＰを発現していないと考えられるコロニーを２４個選択し、３－クロロ安息香酸添加又は非添加のｄＬＢ培地を用いて培養し、ＧＦＰ蛍光の発現をフローサイトメーターにより確認した（図５）。その結果、２４個のうち、３－クロロ安息香酸によってＧＦＰの発現誘導が確認されたものは８個あった。サンプルＤＮＡの一部の塩基配列を決定し、データベース検索したとこ

ろ、ｇｆｐ遺伝子の上流に挿入されていた遺伝子がコードするタンパク質は、表１に示すように加水分解酵素のファミリーに属するものと推測された。さらに、このうちの幾つかは、安息香酸の派生物を代謝するものであることが示唆されている。以上より、本発明の単離方法により新規代謝系遺伝子が獲得できることが確認された。

【００８２】

【表１】

3－クロロ安息香酸の存在下で誘導的に発現されたサンプルDNAと相同性の高いタンパク質

Genbank 登録番号	由来	ORFとの相同性	機能
AE004698_2	*Pseudomonas aeruginosa*	93%	加水分解酵素
AF361470_21	*Rhizobium leguminosarum*	87%	加水分解酵素
AL646058_19	*Ralstonia solanacearum*	86%	加水分解酵素
AE016788_268	*Pseudomonas putida*	86%	加水分解酵素
AF416331_47	*Ruegeria* sp.	82%	加水分解酵素

【００８３】

〔実施例４〕３段階のスクリーニングの効果

環境メタゲノムライブラリーから目的とする代謝系遺伝子及びその発現制御因子を単離するためには、高効率なスクリーニングが必要である。そこで、本実施例においては、本発明の３段階のスクリーニング方法によりどの程度の高効率化が図れるかを調べた。具体的には、実施例２で行ったＲａｌｓｔｏｎｉａライブラリーからのフェノール代謝系遺伝子のスクリーニングにおいて、ＩＰＴＧによる誘導をかけてセルフライゲーションした発現ベクターを含む細胞を除去するスクリーニング段階を行わない従来型のスクリーニング法を用いて実験を行い、実施例１の結果と比較した。

【００８４】

作製したＲａｌｓｔｏｎｉａライブラリーに２ｍＭフェノールによる誘導をかけ、ｄＬＢ培地中３０℃で培養した。翌日フローソーティングによりＧＦＰ蛍光の発現クローンを４，０００個回収し、フェノール非存在下で蛍光を発しないクローンを選択することを目的に、ＩＰＴＧを含んだＬＢ培地プレートに塗布した。３７℃で培養して形成されたコロニーにトランスイルミネーターを用いてＵＶ照射したところ、蛍光非発現コロニーは２個得られた。得られたクローンについてフェノール存在下及び非存在下でのＧＦＰの蛍光の発現をフローサイトメーターにより調べたところ、２個ともフェノール誘導型の発現を示すものではなかった。一方、実施例２に示したように、３段階のスクリーニングによって選択された２４個のクローンのうち３個がフェノールによって誘導されるフェノール代謝系遺伝子をもつものであった。この比較から、ｌａｃプロモーターを含む発現ベクターを用いてセルフライゲーションした発現ベクターが導入された細胞を除去するスクリーニング段階を行うことにより、効率良く代謝系遺伝子が獲得されることが明らかになった。

【００８５】

〔実施例５〕誘導的発現のスクリーニングにおける希釈培地の使用

基質による誘導的発現を指標にして代謝系遺伝子のスクリーニングをする際には、代謝系遺伝子の発現を最大化する培養条件を用いることが重要である。そこで、本実施例においてはｐｏｘオペロンをクローン化した形質転換体を用いて、培地組成のＧＦＰ発現への影響を調べた。

【００８６】
ｐｏｘオペロンをｐ１８ＧＦＰ（図１及び２）のマルチクローニングサイトに挿入したプラスミドが導入された大腸菌を、３種類の培地（ＬＢ培地、ｄＬＢ培地、Ｍ９グルコース培地）で培養し、フェノールによる誘導時及び非誘導時の蛍光強度をフローサイトメーターにより比較した。図６にこの結果を示す。この実験から、ｄＬＢ培地を利用して細胞を培養した場合に、誘導時と非誘導時の蛍光強度に最も大きな差が生じることが明らかとなった。このことから、通常用いられる培地を希釈したものが、本発明の単離方法に有効であることが示唆された。

【００８７】
〔実施例６〕環境メタゲノムライブラリーからの代謝系遺伝子クローニング本実施例においては、本発明の単離方法の有効性を実証するために、石油精製工場由来の活性汚泥から環境メタゲノムライブラリーを構築し、安息香酸代謝系遺伝子のクローニングを試みた。

【００８８】
活性汚泥からのＤＮＡの抽出は、Ｍｕｒｍｅｒの方法（Ｍａｒｍｕｒ，Ｊ．１９６１．Ａ ｐｒｏｃｅｄｕｒｅ ｆｏｒ ｔｈｅ ｉｓｏｌａｔｉｏｎ ｏｆ ｄｅｏｘｙｒｉｂｏｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄ ｆｒｏｍ ｍｉｃｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｓ．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３：２０８＿２１８）によりおこなった。抽出したＤＮＡをＳａｕ３ＡＩにより部分分解し、０．５％アガロースゲル中で電気泳動した。５～８ｋｂの大きさの染色体ＤＮＡ断片をＱＩＡｑｕｉｃｋ ｇｅｌ ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）によりゲル中から抽出した。抽出した染色体ＤＮＡ断片は、ＢａｍＨＩで切断したｐ１８ＧＦＰ内に挿入した。これを用いてエレクトロポレーションにより Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉＪＭ１０９（タカラバイオ）を形質転換し、全体で約１２０，０００個の独立したクローン（プレート培養により出現したアンピシリン耐性コロニー数から計算した）を取得し、これをＩＰＴＧを含むＬＢ液体培地に植菌した。

【００８９】
一晩培養後、フローサイトメーターを用いて、セルフライゲーションしたベクターを保持する細胞を除去するためのスクリーニングを行った。これには、フローサイトメーターＦＡＣＳＶａｎｔａｇｅ ＳＥ（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）と付属するアルゴンレーザー（レーザー波長４８８ｎｍ）を用いた。シース液は１．５倍濃度のＰＢＳ溶液（Ｓｉｌｈａｖｙ ＴＪ．ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔｓ ｗｉｔｈ ｇｅｎｅ ｆｕｓｉｏｎｓ．Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．１９８４）を使用した。これにより、ＧＦｐを発現していない細胞のみ約３，０００，０００個を回収した。

【００９０】
回収した菌懸濁液を希釈培地のｄＬＢ培地に植菌し、一晩培養後、上記のスクリーニングと同様に非発現株を選別するスクリーニング段階を行った（構成的に発現が誘導される遺伝子を含有するベクターを保持する細胞の除去）。

【００９１】
上記スクリーニング段階で回収した菌懸濁液を終濃度２ｍＭの安息香酸を含むｄＬＢ培地で一晩培養し、誘導発現する遺伝子を含有するベクターを保持する細胞を選別するために、フローサイトメーターを用いて、安息香酸に依存してＧＦＰ蛍光を発現するクローンを約８，０００個回収した。回収した細胞の一部を、ＩＰＴＧを含むＬＢ培地プレートに塗布した。プレート上でＧＦＰを発現していないと考えられるコロニーを４８個選択し、安息香酸添加又は非添加のｄＬＢ培地を用いて培養し、ＧＦＰ蛍光の発現をフローサイトメーターにより確認した（図７、Ａ及びＢ）。その結果、４８個のうち、安息香酸によってＧＦＰの発現誘導が確認されたものは２６個あった（図７Ｂ）。これらはフローサイトメーターによる蛍光強度のチャートの形から、４種類のクローンに大別されると考えられた（図７Ｂ）。クローン化されたＤＮＡ断片の一部の塩基配列（ｇｆｐ遺伝子の上流側）を決定し、データベース上で検索したところ、これらの内の一つについては、表２に示すようにアルコール脱水素酵素のファミリーに属することが確認された。このファミリーに含

まれるメンバーのいくつかは、安息香酸の派生物を代謝するものであることが確認されている。以上により、本発明の単離方法により代謝系遺伝子が高効率に得られることが確認された。また他の３種のクローンに関しては、データベース上に相同性の高いアミノ酸配列が認められないことから、新規の安息香酸代謝系遺伝子を含んでいると考えられた。

【００９２】

【表２】

安息香酸の存在下で誘導的に発現されたサンプルDNAと相同性の高いタンパク質

Genbank 登録番号	由来	ORFとの相同性	機能
AL646069_124	*Ralstonia solanacearum*	70%	アルコール脱水素酵素
AF311820S1_3	*Comamonas testosteroni*	59%	アルコール脱水素酵素
PPU24215_2	*Pseudomonas putida*	40%	アルコール脱水素酵素
KPNBUDOPRN_1	*Raoultella terrigena*	43%	アセトイン還元酵素

【００９３】

【発明の効果】

本発明の単離方法により、代謝系遺伝子のＤＮＡ配列に依存することなく、代謝系遺伝子及びその発現制御因子を迅速、効率的かつ確実に単離できるようになる。従って、今までに獲得できなかった新規の代謝系遺伝子のクローニングが期待される。

【００９４】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

〈110〉 Marine Biotechnology Institute

〈120〉 Method for isolating a metabolic system gene

〈130〉 P03-0435

〈160〉 1

〈170〉 PatentIn version 3.1

〈210〉 1
〈211〉 3411
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial

〈220〉
〈223〉 vector

〈400〉 1

gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 60

cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct 120

cactcattag gcaccccagg ctttacactt tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat 180

tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg aattcgagct 240

cggtacccgg ggatcctaat taattaagaa ggagatatac atatggctag caaaggagaa 300

gaacttttca ctggagttgt cccaattctt gttgaattag atggtgatgt taatgggcac 360

aaattttctg tcagtggaga gggtgaaggt gatgcaacat acggaaaact tacccttaaa 420

tttatttgca ctactggaaa actacctgtt ccatggccaa cacttgtcac tactttctct 480

tatggtgttc aatgcttttc aagataccca gatcatatga aacggcatga ctttttcaag 540

agtgccatgc ccgaaggtta tgtacaggaa agaactataa gcttcaaaga tgacgggaac 600

tacaagacac gtgctgaagt caagtttgaa ggtgataccc ttgttaatag aatcgagtta 660

aaaggtattg attttaaaga agatggaaac attcttggac acaaattgga atacaactat 720

aactcacaca atgtatacat cactgcagac aaacaaaaga atggaatcaa agctaacttc 780

aaaattagac acaacattga agatggaagc gttcaactag cagaccatta tcaacaaaat 840

actccaattg gcgatggccc tgtccttta ccagacaacc attacctgtc cacacaatct 900

gccctttcga aagatcccaa cgaaaagaga gaccacatgg tccttcttga gtttgtaaca 960

gctgctggga ttacacatgg catggatgaa ctatactaag catgcaagct tggcactggc 1020

cgtcgtttta caacgtcgtg actgggaaaa ccctggcgtt acccaactta atcgccttgc 1080

agcacatccc cctttcgcca gctggcgtaa tagcgaagag gcccgcaccg atcgcccttc 1140

ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg gcgcctgatg cggtattttc tccttacgca 1200

tctgtgcggt atttcacacc gcatatggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc 1260

atagttaagc cagccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac gggcttgtct 1320

gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 1380

gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag acgaaagggc ctcgtgatac gcctatttt 1440

ataggttaat gtcatgataa taatggtttc ttagacgtca ggtggcactt ttcggggaaa 1500

tgtgcgcgga acccctattt gtttatttt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat 1560

gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca 1620

acatttccgt gtcgccctta ttccctttt tgcggcattt tgccttcctg tttttgctca 1680

cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta 1740

catcgaactg gatctcaaca gcggtaagat ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt 1800

tccaatgatg agcacttta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc 1860

cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc 1920

accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgctgc 1980

cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa 2040

ggagctaacc gctttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcgttggga 2100

accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat 2160

ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca 2220

attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc 2280

ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat 2340

tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag 2400

tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa 2460

gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca 2520

ttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc 2580

ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc 2640

ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc 2700

agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt 2760

cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt 2820

caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc 2880

tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa 2940

ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac 3000

ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg 3060

gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga 3120

gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact 3180

tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa 3240

cgcggcctttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt tctttcctgc 3300

gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gagtgagctg ataccgctcg 3360

ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag gaagcggaag a 3411

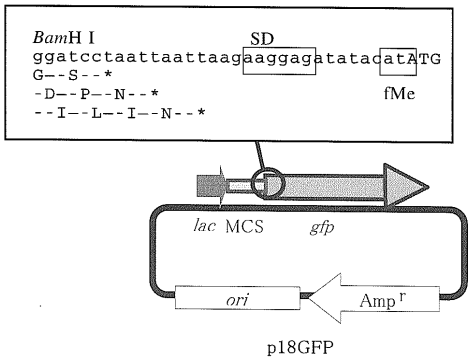
【００９５】
【配列表フリーテキスト】
配列番号１：ｐ１８ＧＦＰベクター
【図面の簡単な説明】
【図１】本発明の方法において使用する発現ベクターの一例、ｐ１８ＧＦＰの塩基配列（配列番号１）を示す図である。
【図２】本発明の方法において使用する発現ベクターの一例、ｐ１８ＧＦＰの概要を示す図である。
【図３】ｐ１８ＧＦＰで形質転換した大腸菌（灰色）とｐＵＣで形質転換した大腸菌（黒色）におけるＧＦＰ発現の蛍光強度を示す図である。
【図４】フェノールによりレポーター遺伝子（ＧＦＰ）の発現が誘導される形質転換体の一例を示す図である。（Ａ）培地中にフェノールを添加しなかった場合。（Ｂ）培地中にフェノールを添加した場合。
【図５】３－クロロ安息香酸によりレポーター遺伝子（ＧＦＰ）の発現が誘導される形質転換体の一例を示す図である。（Ａ）培地中に３－クロロ安息香酸を添加しなかった場合。（Ｂ）培地中に３－クロロ安息香酸を添加した場合。
【図６】ＧＦＰ蛍光発現に対する培地の影響を示す図である。（Ａ）培地としてｄＬＢ培地を用いた場合。（Ｂ）培地としてＬＢ培地を用いた場合。（Ｃ）培地としてＭ９グルコース培地を用いた場合。図中、黒色は非誘導時、灰色は誘導時を表す。
【図７】フローサイトメーターを用いて確認した、安息香酸によりＧＦＰの発現が誘導される形質転換体の一例を示す図である。（Ａ）培地中に安息香酸を添加しなかった場合。（Ｂ）培地中に安息香酸を添加した場合。

【図１】

p18GFP の塩基配列(3411 bp)

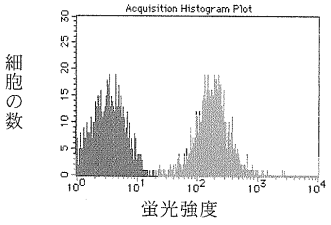
gcgcccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaa
agcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccccaggctttacactttatgcttccggc
tcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgaccatgattacgaattcgagctcgg
tacccggggatcctaattaattaagaaggagatatacatatggctagcaagaggaagaacttttcactggagttgtccca
attcttgttgaattagatggtgatgttaatgggcacaaattttctgtcagtggagagggtgaaggtgatgcaacatacgga
aaacttaccctttaaatttattttgcactactggaaaactacctgttccatggccaacacttgtcactactttctcttatggt
gttcaatgctttccaagatacccagatcatatgaaacggcatgactttttcaagagtgccatgcccgaaggttatgtacag
gaaagaactatatgcttcaaagatgacgggaactacaagacacgtgctgaagtcaagtttgaaggtgataccctttgttaat
agaatcgagttaaaaggtattgattttaaagaagatggacacattcttggacacaaattggaatacaactataactcacac
aatgtatacatcactgcagacaaacaaaagaatggaatcaaagctaacttcaaaattagacacaacattgaagatggaagc
gttcaactagcagaccattatcaacaaaatactccaattggcgatggccctgtccttttaccagacaaccattacctgtcc
acaccatctgccctttcgaaagatcccaacgaaaagagagaccacatggtccttcttgagtttgtaacagctgctgggatt
acacatggcatggatgaactatactaagcatgcaagcttggcactggccgtcgttttacaacgtcgtgactgggaaaaccc
tggcgttacccaacttaatcgccttgcagcacatccccctttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcg
ccctttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcctgatgcggtatttctccttacgcatctgtgcggtatttc
acacccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagccccgacacccgccaacacccgc
tgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtca
gaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgagacgaaagggcctcgtgatacgcctatttttataggttaatgtcatgat
aataatggtttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatttttctaaataca
ttcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattca
acatttccgtgtcgcccttattcccttttttgcggcattttgccttcctgtttttgctcacccagaaacgctggtgaaagt
aaaaatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttt
tcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgccgg
gcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttac
ggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgataacactgcggccaacttacttctgacaac
gatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccgga
gctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaactattaac
tggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcg
ctcggcccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcact
ggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagaca
gatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatactttagattgattt
aaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatcctttttgataatctcatgaccaaaatcccttaacgtgagtt
ttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctgctg
cttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaac
tggcttcagcagagcgcagatacaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagc
accgcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttgga
ctcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaac
gacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggta
tccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgt
cgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaa
cgcggcctttttacggttcctggccttttgctggccttttgctcacatgttctttcctgcgttatcccctgattctgtgga
taaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgagga
agcggaaga

【図２】

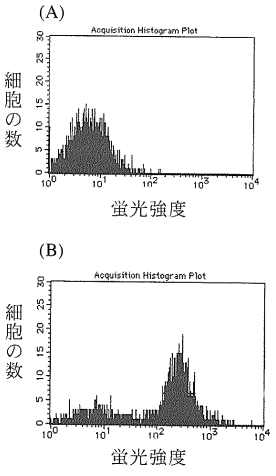


p18GFP

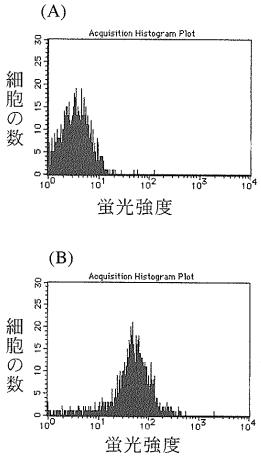
【図３】



【図４】

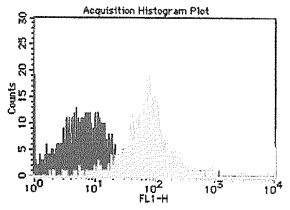


【図５】

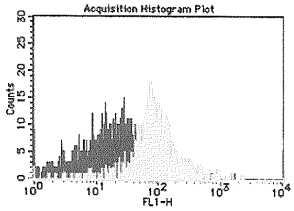


【図６】

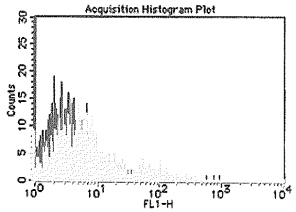
(a) dLB 培地



(b) LB 培地

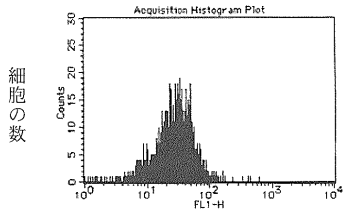


(c) M9 グルコース培地

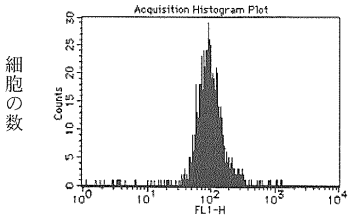


【図７】

(A)



(B)



フロントページの続き

Ｆターム(参考) 4B024 AA11 AA20 BA80 CA01 DA06 EA04 FA10 GA14 HA08 HA20
4B063 QA08 QQ06 QQ07 QQ13 QQ21 QQ42 QR14 QR32 QR42 QR50
QR75 QS28 QS36 QS39 QX01